动物学研究 2003, Jun. 24 (3): 161~167 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

猕猴胚胎干细胞的诱导分化和凋亡

裴轶劲[1,2], 季维智[1,3]
(1. 中国科学院昆明动物研究所, 云南省动物生殖生物学重点实验室, 云南 昆明 650223;
2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 采用单层培养法研究维生素A酸(RA)、神经生长因子(NGF)、上皮生长因子(EGF)和碱性成纤维生长因子(bFGF)对猕猴胚胎干细胞系R366.4的诱导分化和凋亡的作用。结果表明: ①不添加任何生长因子的条件下, 细胞分化不定向, 各种细胞所占的比例表现出明显的随机性; ②添加单一生长因子能促进细胞的分化进程, 并使某一类或某几类的分化细胞比例上升, RA和NGF均能促进神经样细胞的形成, EGF促进内皮样细胞的形成, bFGF提高成纤维样细胞的比例; ③在分化的过程中伴有细胞早期和晚期凋亡的发生, RA和NGF可增加细胞凋亡的数量。这种由生长因子诱导的动物胚胎干细胞的分化可能存在种间差异。

关键词: 猕猴; 胚胎干细胞; 生长因子; 分化; 细胞凋亡
中图分类号: Q959.848; Q25 **文献标识码**: A **文章编号**: 0254-5853(2003)03-0161-07

Induced Differentiation and Apoptosis of Rhesus Monkey Embryonic Stem Cells

PEI Yi-jin[1,2], JI Wei-zhi[1,3]
(1. *The Yunnan Key Laboratory for Animal Reproductive Biology, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming* 650223, *China*; 2. *Graduate School, the Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100039, *China*)

Abstract: To investigate the effect of retinoic acid (RA), nerve growth factor (NGF), epidermal growth factor (EGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) on the differentiation and apoptosis of rhesus monkey embryonic stem (rES) cell line R366.4, rES cells were cultured in monolayer state *in vitro*, and the experiment resulted in: ①The percentage of differentiated rES cells increased along with the elongated duration of culture. ②The rES cells differentiated into heterogeneous somatic cells, whose proportions were at random, in the absence of exogenous growth factors. ③Single growth factor could promote progress of differentiation, and increased the proportion of one or several types of differentiated cells; neuron-like cells increased in the presence of RA or NGF, while endothelium-like cells and fibroblast-like cells increased in the presence of EGF and bFGF, respectively. ④During the differentiation of rES cells the early and the late apoptosis happened, and the apoptosis could be promoted by RA and NGF. The four growth factors have the potential to stimulate differentiation of rES cells in different ways. The ES cell differentiation induced by the growth factor may be species-specific.

Key words: Rhesus monkey; Embryonic stem cell; Growth factor; Differentiation; Apoptosis

胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES cells)具有长期的自我更新能力, 在体外抑制分化的条件下保持不分化的状态; 如果撤去抑制分化的因素, 可以分化形成三胚层来源的各种细胞类型; 将ES细胞注射入重度免疫缺陷小鼠的体内时会形成畸胎瘤(Evans & Kaufman, 1981)。因此, ES细胞是研究细胞组织分化机理、移植和发育生物学的较好的体外模型。然而迄今为止, 仍未能从ES细胞诱导分化出单一的细胞种类, 其主要原因是诱导ES细胞定向分化的因子并不清楚。

收稿日期: 2003-01-22; 接受日期: 2003-02-11
基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目(2001CB5099)
3. 通讯作者(Corresponding author), Tel: 0871-5139413, E-mail: wji@mail.kiz.ac.cn

维生素A酸（retinoic acid，RA）（Bain et al，1996；Schuldiner et al，2000）、神经生长因子（nerve growth factor，NGF）（Wobus et al，1988；Schuldiner et al，2000）、上皮生长因子（epidermal growth factor，EGF）（Rubin et al，1991；Schuldiner et al，2000）和碱性成纤维生长因子（basic fibroblast growth factor，bFGF）（Rohwedel et al，1994；Schuldiner et al，2000）等生长因子，均已被证实对小鼠和人ES细胞形成的胚样体有诱导分化作用。

Okazawa et al（1996）和Du et al（1998）均报道在小鼠ES细胞的诱导分化中，RA影响晚期凋亡。在某些神经细胞的体外培养中，NGF通过结合p75受体而发挥其诱导凋亡的作用（Frade，2000）。细胞凋亡是由基因控制的、为维持内环境稳定的一种细胞自主性的死亡过程，在生物体的发育形成及功能维持中起着重要的作用。在细胞凋亡的过程中，细胞的内部结构或形态会发生多种变化。其中一个变化是在细胞凋亡的早期，磷脂酰丝胺酸从细胞膜内层转移到细胞膜外层，暴露于细胞膜表面（Fadok et al，1992）；而DNA的断裂发生较晚，在细胞凋亡的晚期（Schwartzman & Cidlowski，1993）。

灵长类动物的ES细胞是研究灵长类细胞分化的较好的体外模型(Thomson et al,1995),但其定向诱导分化报道甚少。本实验旨在研究RA、NGF、bFGF和EGF 4种生长因子对单层培养的猕猴ES细胞的诱导分化作用和早期、晚期凋亡的影响,为灵长类动物ES细胞进一步诱导分化的研究提供信息。

1 材料与方法

1.1 实验动物和细胞系

Balb/c纯系小鼠，购自中国科学院上海实验动物中心；猕猴胚胎干细胞系R366.4由美国威斯康星大学灵长类动物研究中心Thomson教授提供。

1.2 主要试剂

高糖DMEM、非必需氨基酸和Dispase为Gibco/BRL公司（Grand Island，NY，USA）产品；EDTA、谷氨酰胺、明胶、2-巯基乙醇、胰蛋白酶、多聚甲醛、bFGF、NGF、RA和EGF为Sigma公司（St. Louis，MO，USA）产品；胎牛血清FBS和小牛血清BCS为HyClone公司（Logan，Utah，USA）产品；凋亡试剂盒ApoAlert DNA Fragmentation Assay Kit和ApoAlert Annexin Ⅴ为Clontech公司（Palo Alto，CA，USA）产品；碱性磷酸酶试剂盒购自中国华美生物工程公司。

1.3 主要溶液的配制

在高糖DMEM培养基中按照10%～15%的比例添加BCS，配制小鼠胎儿成纤维细胞培养液；在100 mL的无钙镁PBS中分别添加0.25 g胰蛋白酶和0.04 g EDTA，配制小鼠胎儿成纤维细胞消化液；在780 mL高糖DMEM培养基中添加200 mL胎牛血清，再分别添加1 mmol谷氨酰胺、0.1 mmol 2-巯基乙醇和10 mL 100×非必需氨基酸，配制猕猴胚胎干细胞培养液；在780 mL高糖DMEM培养基中添加200 mL KnockOut™SR，再分别添加1 mmol谷氨酰胺、0.1 mmol 2-巯基乙醇和10 mL 100×非必需氨基酸，配制猕猴胚胎干细胞分化培养液；在10 mL猕猴胚胎干细胞培养液中添加0.1 g dispase，配制猕猴胚胎干细胞消化液。上述溶液经0.22 μm滤膜过滤，4 ℃保存。

1.4 小鼠胎儿成纤维细胞饲养层的制备

参照Abbondanzo et al（1993）和Thomson et al（1995）的方法制备小鼠胎儿成纤维细胞（primary murine embryonic fibroblasts，PMEFs）饲养层。选取6～8周龄健康的Balb/c雌鼠和雄鼠，合笼；断颈处死怀孕13～14 d的雌鼠，取出小鼠胎儿，去掉胎儿头、四肢、内脏，尽量剪碎；加入小鼠胎儿成纤维细胞消化液消化，再加入小鼠胎儿成纤维细胞培养液终止消化；离心弃去上清液，加入适量的小鼠胎儿成纤维细胞培养液，打匀细胞，然后将细胞接种于培养瓶或培养皿中。当细胞生长至对数生长期长满时，即可消化传代；收集5代以内生长良好的小鼠胎儿成纤维细胞，经3 500 rads剂量的γ射线照射10～20 min后，按2×10^6～4×10^6个/mL的浓度装在冷冻管中-70 ℃放置过夜，然后投入液氮中冻存。在培养猕猴胚胎干细胞前，先在六孔或四孔培养板铺0.1%明胶，12 h后吸尽明胶，37 ℃水浴复苏小鼠胎儿成纤维细胞，加入小鼠胎儿成纤维细胞培养液，1 300 r/min离心10 min，弃去上清液，然后添加适量小鼠胎儿成纤维细胞培养液，将细胞按0.75×10^5个/mL密度铺板，6孔板每孔2.5 mL，4孔板每孔0.5 mL，第二天即可用于猕猴胚胎干细胞的培养。

1.5 猕猴胚胎干细胞的培养和分化

猕猴胚胎干细胞系R366.4的培养如Thomson et al(1995)、Thomson & Marshall(1998)描述:将装有

猕猴胚胎干细胞的冷冻管从液氮中取出，快速投入37 ℃水浴，解冻后加入猕猴胚胎干细胞培养液，离心弃去上清夜，加入新鲜猕猴胚胎干细胞培养液，轻轻打匀，铺在已经铺了 PMEFs 的 4 孔板或 6 孔板上；当猕猴胚胎干细胞在培养皿中长至对数生长期时，经猕猴胚胎干细胞消化液作用后从 PMEFs 饲养层上消化下来，再经 0.5 mmol/L EDTA 处理，加入猕猴胚胎干细胞分化培养液打匀，铺在已经铺了明胶的 35 mm 直径的培养皿上进行分化实验。

除对照组外，分别在 4 个实验组的猕猴胚胎干细胞分化培养液中加入 4 种生长因子的分化作用浓度（RA：10^{-6} mol/L，NGF：100 ng/mL，bFGF：10 ng/mL，EGF：100 ng/mL）的溶液，然后放在 5%CO_2、37 ℃的培养箱中培养，每 2 d 换液 1 次，在 Nikon 倒置显微镜下观察细胞的形态。

1.6 碱性磷酸酶活性的测定

各组细胞在分化培养到 5、10 和 15 d 时，分别在室温下用含 7.5%蔗糖的 1%多聚甲醛固定 10 ~ 20 min，然后用碱性磷酸酶试剂盒染色。根据厂家说明，先用底物缓冲液平衡，在新鲜配制的 NBT（nitroblue tetrazdium salt）/BCIP（5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate，toluidinium salt）染色液中室温避光的条件下染色 30 min 以上，水洗。以未分化的胚胎干细胞因表达高的碱性磷酸酶活性被染成深蓝色为阳性对照，在 100 倍 Zeiss 倒置显微镜下观察分化细胞，统计分化细胞百分率即［（总细胞数 - 碱性磷酸酶强阳性细胞数）/总细胞数］ × 100%。

1.7 细胞凋亡检测

分别收集各组分化培养 1、5 和 10 d 的细胞做凋亡检测。早期凋亡细胞的检测用 ApoAlert Annexin Ⅴ试剂盒处理。根据厂家的说明，先用 1 × Binding Buffer 洗涤，弃去 1 × Binding Buffer，加入 200 μL 1 × Binding Buffer，再加入 5 μL Annexin Ⅴ 和 10 μL Propidium Iodide，在室温黑暗中作用 5 ~ 15 min，2%甲醛固定，在 100 倍 Zeiss 荧光倒置显微镜下观察并拍照。结合上 Annexin Ⅴ 的细胞的细胞膜呈绿色，为早期凋亡的细胞；膜不完整的细胞的细胞质红色，细胞膜绿色，为晚期凋亡或坏死的细胞。统计处于凋亡早期的细胞数占细胞总数的百分率。晚期凋亡细胞的检测经 ApoAlert DNA Fragmentation Assay Kit 处理细胞。用 PBS 洗 2 次后，在新鲜配制的 4%甲醛/PBS 中 4 ℃固定 25 min，然后 PBS 洗 2 次，加入预冷的 0.2%Txiton X - 100/PBS，在冰上作用 5 min，PBS 洗 2 次后，平衡缓冲液作用 10 min，加入末端脱氧核苷酸转移酶培育液（TdT incubation buffer），在 37 ℃避光作用 60 min，在室温下用 2 × SSC 洗 15 min，再用 PBS 洗 2 次，0.5 mg/mL PI/PBS 作用 5 ~ 10 min，水洗，封片观察，晚期凋亡细胞的核呈绿色。统计处于凋亡晚期的细胞数占细胞总数的百分率。

1.8 实验数据的处理

实验重复 3 次，百分率数值进行平方根的反正弦转换（Arcsin），然后通过单因素方差分析和最小显著差数法，比较各组数据差异的显著性。$P <$ 0.05 视为有显著差异。

2 结 果

2.1 生长因子对分化进程及分化细胞种类的影响

在 PMEFs 层上培养的未分化的猕猴胚胎干细胞，细胞个体小，细胞核大，具 1 ~ 2 个核仁，细胞呈扁平疏松状集落生长，细胞之间的界限不清（图 1）。将消化下来的胚胎干细胞铺到明胶板上，添加或不添加各种生长因子，都会逐渐发生分化。分化细胞的比例随培养天数的增加逐渐升高，并呈现出多种细胞形态。添加生长因子可使某一类或某几类分化细胞的比例升高，在 5 ~ 10 d 内变化趋势明显。RA、NGF、bFGF 以及 EGF 分别对形成神经样细胞、神经和上皮样细胞、成纤维样细胞以及内皮样细胞有较强作用（表 1，图 2 ~ 5）。但各种生长因子都不能单一促进某一类细胞的分化。

在猕猴胚胎干细胞分化的第 5 天，部分细胞分化，与对照比较，4 种生长因子均能促进分化，RA 促进分化的作用较 NGF、bFGF 和 EGF 更为显著，FGF、EGF、NGF 之间的促进作用没有差异；第 10 天，大部分细胞已分化，RA 促进分化的作用最强，其次为 bFGF 和 EGF，两者促进分化的作用相似，也都比 NGF 强；第 15 天，除 NGF 和对照组还有极少比例的细胞未分化外，其余各组细胞基本全部分化。

2.2 生长因子对细胞凋亡程度的影响

在 ES 细胞分化的过程中，伴随有凋亡的发生。经检测，一些处于凋亡早期（图 6），一些处于凋亡晚期（图 7）。图 8 示细胞分化至 1、5 和 10 d 时的早期凋亡率和晚期凋亡率。

对照组的早期凋亡率保持在 13.7% ~ 19.5%；晚期凋亡率较低，保持在 1.6% ~ 3.4%。RA 组在分化的各个时期，早期凋亡率均较对照组显著上

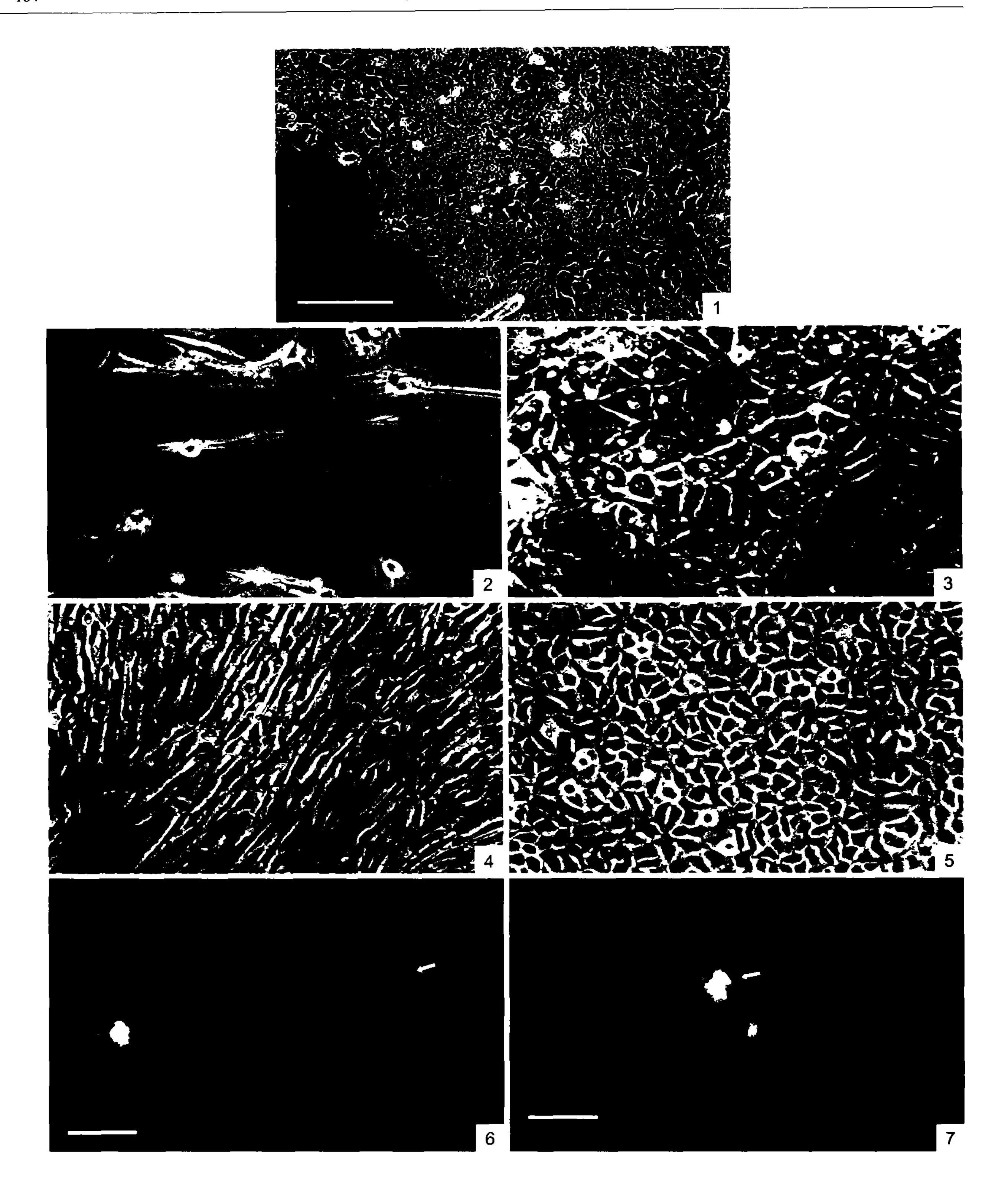


图 1~7 4种生长因子诱导的猕猴胚胎干（rES）细胞的分化细胞的形态及分化过程中 rES 细胞的凋亡

Figs.1-7 Morphology of differential cells, which were induced from rhesus monkey embryonic stem (rES) cells by four growth factors, and apoptosis of rES cells in differntiation

1. 未分化的猕猴胚胎干细胞，标尺 = 100 μm (Undifferentiation rhesus monkey embryonic stem cells, bar = 100 μm);
2. 维生素 A 酸诱导的神经样细胞，标尺 = 5 μm (Neuron-like cells induced by retinoic acid, bar = 5 μm);
3. 神经生长因子诱导的上皮样细胞，标尺 = 5 μm (Epithelium-like cells induced by nerve growth factor, bar = 5 μm);

4．碱性成纤维生长因子诱导的成纤维样细胞，标尺 = 5 μm（Fibroblast-like cells induced by basic fibroblast growth factor，bar = 5 μm）；
5．上皮生长因子诱导的内皮样细胞，标尺 = 5 μm（Endothelium-like cells induced by epidermal growth factor，bar = 5 μm）；
6．箭头示结合上 Annexin Ⅴ 的早期凋亡细胞，标尺 = 25 μm（Arrow showing an early apoptosis cell with bound annexin Ⅴ，bar = 25 μm）；
7．箭头示晚期凋亡细胞，标尺 = 25 μm（Arrow showing a late apoptosis cell，bar = 25 μm）。

表 1　4 种生长因子对猕猴胚胎干细胞分化的影响

Table 1　Effects of four growth factors on the differentiation of rhesus monkey embryonic stem cells

天数 day (d)	分化细胞率 Percentage of differentiated cells (%)*				
	对照组 Control group	RA 组 RA group	NGF 组 NGF group	bFGF 组 bFGF group	EGF 组 EGF group
5	52.3[c]	76.5[a]	64.5[b]	67.5[b]	64.8[b]
10	65.5[d]	91.5[a]	73.0[c]	83.0[b]	81.0[b]
15	96.2	100	98.5	100	100
	分化细胞种类 Types of differentiated cells				
	对照组 Control group	RA 组 RA group	NGF 组 NGF group	bFGF 组 bFGF group	EGF 组 EGF group
10	分化细胞种类多样，比例随机 Ratios of heterogeneous cells were at radom	42% 的细胞为神经样细胞 42% cells were neuron-like cells	12% 的细胞为神经样细胞，7% 的细胞为上皮样细胞 12% cells were neuron-like cells，7% cells were epithelium-like cells	32% 的细胞为成纤维样细胞 32% cells were fibroblast-like cells	8% 的细胞为内皮样细胞 8% cells were endothelium-like cells

*上标不同的同行值存在显著差异（$P<0.05$）。
* The values with different superscripts in the same row were different significantly ($P<0.05$).

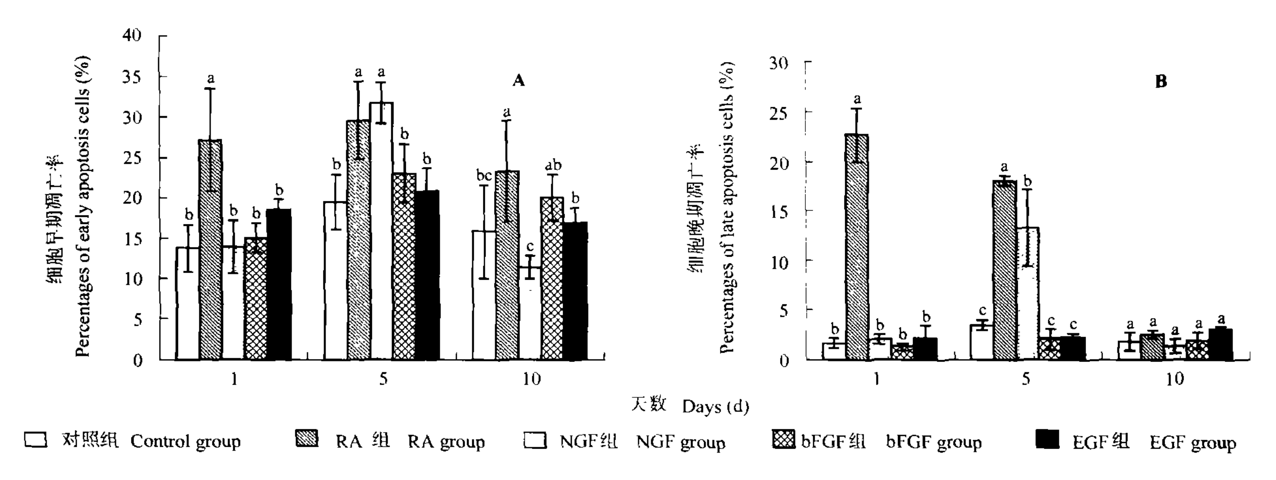


图 8　猕猴胚胎干细胞分化过程中 4 种生长因子对细胞凋亡的影响

Fig.8　Effects of four growth factors on apoptosis of rhesus monkey embryonic stem cells in differentiation

A．早期凋亡（Early apoptosis）；B．晚期凋亡（Late apoptosis）。

数据以平均数 ± 标准差表示。不同的字母表示同一天的凋亡率有显著差异（$P<0.05$）。

The data were expressed as mean ± *SD*. The percentages of apoptosis with different superscripts in the same days were significantly different ($P<0.05$).

升；晚期凋亡率在第 1 天和第 5 天较对照显著升高，第 15 天降至 2.5%，与对照无差异。NGF 在分化的第 5 天，早期凋亡率和晚期凋亡率均较对照组显著提高；第 1 天、第 10 天早期凋亡率、晚期凋亡率与对照组无差异。bFGF 和 EGF 组早期凋亡率和晚期凋亡率均与对照组无差异。

3 讨　论

Thomson et al（1995）报道猕猴胚胎干细胞一旦撤去饲养层，便会立即发生分化。这在我们的实

验中也得到了证实。在单层培养中，生长因子的添加可以促进分化。第5天各组都有一定比例的细胞发生分化，并随时间的进程分化比例逐渐升高，到第15天各组绝大多数的细胞已分化。单层培养条件下，在各组分化的细胞中较易观察到一定比例的某类细胞如神经样细胞、内皮样细胞及成纤维样细胞。这些种类细胞的形成，并不十分需要细胞与细胞间的相互作用。由于单层培养的分化体系相对简单，因此可通过该培养技术来研究生长因子在某些细胞种类分化中的作用。

RA是哺乳类生长和分化中非常重要的调节因子（Bain & Gottlieb，1994），是一种得到广泛应用的多种细胞分化诱导剂。已经证实可以时间和浓度依赖的方式，使小鼠ES细胞形成的胚样体生成不同的细胞类型。RA对细胞诱导分化的作用较复杂（Rohwedel et al，1999）。在本实验中RA主要诱导了猕猴胚胎干细胞形成神经样细胞，与RA主要诱导单层培养的小鼠ES细胞形成成纤维样细胞的实验结果不同（Xu et al，1991），这很可能是种属差异造成的。

NGF是一种神经营养调节因子，添加100 ng/mL NGF可提高人ES细胞形成的胚样体生成神经细胞的比例，但效果不如10^{-6} mol/L RA（Schuldiner et al，2001）。我们的实验证实在单层培养的条件下100 ng/mL NGF也能诱导神经样细胞的生成，而且效果也不如10^{-6} mol/L RA。在添加NGF的情况下，还出现相当比例的上皮样细胞。结果显示NGF具有诱导猕猴胚胎干细胞形成多种细胞的能力，关于其诱导形成不同的细胞类型的机制有待进一步的研究。

已经证实FGF在正常的胚胎发育中，作为有丝分裂源影响神经外胚层和中胚层来源的细胞，调节这些细胞的分化而作为神经营养因子和影响血管的发生（Jaye et al，1992）。FGF在小鼠胚胎干细胞的分化中起着多方面的作用，在不同的细胞种类的分化形成过程中既有刺激增殖的作用（Okabe et al，1996）又能诱导分化（Schuldiner et al，2000）。在人ES细胞形成的胚样体中添加bFGF可以得到大量的成纤维样的细胞（Schuldiner et al，2000）。我们的实验与该结果一致，bFGF的添加也有利于成纤维样细胞的生成。EGF引起人ES细胞向三胚层分化（Schuldiner et al，2000）。我们的实验中EGF的添加可以得到部分的内皮样细胞。在分化过程中bFGF和EGF的添加不影响细胞凋亡的程度，因而我们推测在单层培养中这两种生长因子更有可能是通过影响增殖或诱导分化而起作用。

本研究结果显示，在分化过程中细胞发生早期凋亡和晚期凋亡，而且发生磷脂酰丝氨酸转移到细胞膜外的早期凋亡的几率远远高于出现DNA断裂的晚期凋亡的几率。一旦execution caspases被激活，凋亡的发生便不可逆转；因此将execution caspases的激活作为凋亡的一个必需的标记（Huppertz et al，1999）。而发生在这之前的磷脂酰丝氨酸转移到细胞膜外的形态变化是可逆的，之后的DNA断裂是不可逆的；进入早期凋亡的一部分细胞进入晚期凋亡，导致早期凋亡率高于晚期凋亡率。在加入RA或NGF后，都表现出随分化的进程影响细胞凋亡的发生，但两者的影响有所不同。添加RA后第1天就会促进晚期凋亡的发生，这与Okazawa et al（1996）在小鼠胚胎干细胞的研究结果一致。RA在猕猴胚胎干细胞分化的各个时期一直促进早期凋亡的发生。在分化的第1天和第5天促进晚期凋亡的发生，在第10天随着绝大多数细胞的分化不再影响晚期凋亡的发生，显然RA对晚期凋亡的影响与分化的程度相关。添加NGF，只在分化的第5天显著提高早期凋亡率和晚期凋亡率。NGF通过作用受体Trk提高细胞的存活，又可以作用p75受体诱导凋亡（Frade，2000）；因此它对有不同的这两种类型受体的细胞作用不同，而在ES细胞分化过程中NGF的添加促进凋亡的发生可能与分化细胞受体的表达的变化有关。

在单层培养分化的条件下，RA、NGF、EGF和bFGF 4种生长因子均影响了猕猴胚胎干细胞的分化，其作用可能是直接诱导分化，添加单一生长因子可提高细胞分化为某一类或某几类细胞的比例；也可能是促进某些分化细胞的凋亡程度，进而影响分化。尽管不同的生长因子对猕猴胚胎干细胞分化的途径和进程的影响不同，但均未能诱导分化出单一类型的细胞。在进一步的实验中，我们将研究各生长因子的不同组合对猕猴胚胎干细胞的诱导分化作用及其机制。

参考文献：

Abbondanzo SJ, Gadi I, Stewart CL. 1993. Derivation of embryonic stem cell lines [A]. In: Wassarman PM, DePamphilis ML. Methods in Enzymology Volume 225: Guide to Techniques in Mouse Development [C]. San Diego: Academic Press, INC. 803 – 822.

Bain G, Gottlieb DI. 1994. Expression of retinoid X receptors in P19 embryonal carcinoma cells and embryonic stem cells [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **200**: 1252 – 1256.

Bain G, Ray WJ, Yao M, Gottlieb DI. 1996. Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture [J]. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **223**: 691 – 694.

Du ZW, Cong XQ, Yao X. 1998. Expression of retinoic acid receptor gamma gene in ES cells and its effect on their differentiation and apoptosis [J]. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*, **31** (2): 155 – 163. [杜忠伟，丛笑倩，姚　鑫. 1998. 维生素 A 酸受体 γ 基因表达及其对 ES 细胞分化和凋亡的影响. 实验生物学报，**31** (2): 155 – 163.]

Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos [J]. *Nature*, **292**: 154 – 156.

Fadok VA, Voelkler DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. 1992. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptosis lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages [J]. *J. Immunol.*, **148**: 2207 – 2216.

Frade JM. 2000. Unscheduled re-entry into the cell cycle induced by NGF precedes cell death in nascent retinal neurons [J]. *J. Cell. Sci.*, **113**: 1139 – 1148.

Huppertz B, Frank HG, Kaufmann P. 1999. The apoptosis cascade-morphological and immunohistochemical methods for its visualization [J]. *Anat. Embryol.*, **200**: 1 – 18.

Jaye M, Schlessinger J, Dionne CA. 1992. Fibroblast growth factor receptor tyrosine kinases: Molecular analysis and signal transduction [J]. *Biochim. Biophys. Acta*, **1135**: 185 – 199.

Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro AC, Segal M, Mckay RD. 1996. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells *in vitro* [J]. *Mech. Dev.*, **59**: 89 – 102.

Okazawa H, Shimizu J, Kamei M, Imafuku I, Hamada H, Kanazawa I. 1996. Bcl-2 inhibits retinoic acid-induced apoptosis during the neural differentiation of embryonal stem cells [J]. *J. Cell. Biol.*, **132**: 955 – 968.

Rohwedel J, Maltsev V, Bober E, Arnold HH, Hescheler J, Wobus AM. 1994. Muscle cell differentiation of embryonic stem cells reflects myogenesis *in vivo*: Developmentally regulated expression of myogenic determination genes and functional expression of ionic currents [J]. *Dev. Biol.*, **164**: 87 – 101.

Rohwedel J, Guan K, Wobus AM. 1999. Induction of cellular differentiation by retinoic acid *in vitro* [J]. *Cell Tissue Org.*, **165**: 190 – 202.

Rubin JS, Chan AM, Bottaro DP, Burgess WH, Taylor WG, Cech AC, Hirschfield DW, Wong J, Miki T, Finch PW, Aaronson SA. 1991. A broad-spectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 415 – 419.

Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N. 2000. From the cover: Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 11307 – 11312.

Schuldiner M, Eiges R, Eder A, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Goldstein R, Benvenisty N. 2001. Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells [J]. *Brain Res.*, **913**: 201 – 205.

Schwartzman RA, Cidlowski JA. 1993. Apotosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death [J]. *Endocrine. Rev.*, **14**: 133 – 151.

Thomson JA, Marshall VS. 1998. Primate embryonic stem cells [J]. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **38**: 133 – 165.

Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP. 1995. Isolation of a primate embryonic stem cell line [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 7844 – 7848.

Wobus AM, Grosse R, Schoneich J. 1988. Specific effects of nerve growth factor on the differentiation pattern of mouse embryonic stem cells *in vitro* [J]. *Biomed. Biochem. Acta*, **47**: 965 – 973.

Xu J, Cong XQ, Yao X. 1991. Induced differentiation of mouse embryonic stem cells by retinoic acid and dibutyryl cyclic adenosine monophosphate [J]. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*, **24** (4): 353 – 367. [徐　洁，丛笑倩，姚　鑫. 1991. 维生素 A 酸和双丁酰基环腺苷单磷酸对小鼠胚胎干细胞的诱导分化. 实验生物学报，**24** (4): 353 – 367.]